

(12)特許協力集約に基づいて公開された国際出願

WO 03/011911 A1

(19) 世界知的所有権権利
国際登録品目(10) 国際公開番号
WO 03/011911 A1(43) 国際公開日
2003年2月13日 (13.02.2003)

PCT

WO 03/011911 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/46, A61P 31/02, 35/00,

JP

3700, 3706, C07K 19/00 // A61K 38/00

(21) 國際出願番号:
PCT/JP2002/07735(22) 國際出願日:
2002年7月30日 (30.07.2002)(25) 国際出願の書類:
日本語(16) 国際公開の書類:
日本語(39) 优先権データ:
特許2001-221200 2001年7月11日 (01.07.2001) JP

(74) 代理人: 大富和久 (OHMUKazuji); 〒101-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 通商第2ビル7階 大富和久事務所 (Tokyo) (JP).

(71) 出願人(米国を除く全ての書類について): 小野
製薬株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP] 〒501-8529 大阪府大阪市中央区道修
町2丁目1番6号 Osaka (JP).(72) 発明者: オンリーワークス (米国についてのみ): 岩田 真樹
(SHIBAYAMA, Shinji) [JP] 〒618-833 大阪府三(77) 発明者: 木戸信 (MOTOI, Makoto) [JP] 〒606-0001
京都市左京区岩倉大原町19-4 Kyoto (JP),
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TM, ヨーロッパ
合規 (AU), BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, ES, FI, FR,
IL, LV, MA, MD, MG, MR, MN, MW, MK, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, TO, ZA, ZM, ZW).

(84)

特許国(広場): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MV,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 2MA, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TM), ヨーロッパ
合規 (AU), BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, ES, FI, FR,
IL, LV, MA, MD, MG, MR, MN, MW, MK, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, TO, ZA, ZM, ZW).(54) Title: SUBSTANCE SPECIFIC TO PD-1
(54) 発明の名称: PD-1に対する物質

(57) Abstract: A substance comprising a substance recognizing PD-1, a substance recognizing a membrane-protein occurring in the cell membrane wherein PD-1 is expressed and a linker. The substance specific to PD-1 can selectively recognize PD-1 and the membrane-protein occurring in the cell membrane wherein PD-1 is expressed and transfer a PD-1 suppressive signal. Thus, it is useful in treating and/or preventing diseases caused by immunopathology.

(57) 要約:

PD-1を認識する物質、PD-1が表現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質。

本発明のPD-1に対する特異性を有する物質は、PD-1およびPD-1が表現している細胞膜に存在する膜タンパクを選択的に認識し、PD-1

の抑制シグナルを伝達することができ、免疫異常にによる疾患の治療および/または予防に有用である。

明細書

PD-1に対し特異性を有する物質

5 技術分野

本発明は、PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質に関する。

背景技術

10 免疫システムは多様な外来抗原に対し応答できる機構を獲得した。その機構とはT細胞、B細胞においてV(D)J断片の相補えにより抗原レセプターの多様性をもたらすものである。この機構は同時に自己反応性リンパ球を産生する結果となり、これら自己反応性リンパ球は胸腺や骨髓における負の選択によって除かれ、更に末梢においてもクローン除去やアナジーという

15 自己免疫対応機構により制御されている。

自己免疫疾患は、自己免疫対応の破綻により発症すると考えられるが、その発症機序の解明に向けて様々な疾患モデルマウスを用いた研究がなされてきた。しかし、自己免疫疾患の病因的解明や自己免疫対応の分子機構に関する

19 には依然不明な点が多い。このような状況において、單一遺伝子欠損にて自己免疫疾患を発症するマウスの存在は、分子生物学的な観点から病因学的研究を図る上で極めて重要である。我々は全身体性リノベ受容を起す CTLA4-/-マウス (Waterhouse, P. et.al.:Science,270:985~988, 1995, Tivol, E.A. et.al.:Immunity, 3: 541~547, 1995) SHP-1欠損 moothen mice (Shultz, L.D. et.al.:Cell,73: 1445~

1454, 1993)、TGF- β -1ノックアウトマウス (Shull, M.M. et.al.:Nature, 359: 693 ~699, 1992) や、糸球体腎炎を発症するlyn-/-マウス (Hibbs, M.L. et.al.:Cell, 83: 301~311, 1995)、及び FCR1-/-B-/-マウス (Bolland, S. &

Ravetch, J.V.:Immunity,13: 277~285, 2000) 等はその代表であり、これらの分子と自己免疫対応との関連が研究されている。

PD-1は免疫プロリンファミリーに属する55kDaのI型タンパクである。マウスPD-1ヒトPD-1は共に288個のアミノ酸からなり、N末端のシグナルペプチド(20アミノ酸)と中间部位に細胞膜貫通領域である疏水性領域を有する(The EMBO J., vol. 11(11), 3887~3895 (1992);特開平5-336973号;EMBL/GenBank/DDBJ Acc. No.X 67914, Genomics23:704 (1994);特開平7-291996号(米国特許第5629204号))。

PD-1の発現は、臓器細胞においてはCD4-CD8-からCD4+CD8+細胞に分化する際に認められる(Nishimura, H. et.al.:Int.Immunol, 8:773 ~780, 1996, Nishimura, H. et.al.:J.Exp.Med, 191: 891~898, 2000)。また、末梢においてPD-1の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化したT細胞、B細胞(Agata, Y. et.al.:Int.Immunol, 8: 765~772, 1996)及び活性化マクロファージを含む骨髓細胞に認められる。

15 PD-1は、その細胞内領域にITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を有し、従って免疫反応における負の制御因子と考えられる。PD-1欠損マウスにおいて糸球体腎炎、闘争炎といったループ様自己免疫疾患(C57BL/6遺伝子背景)(Nishimura, H. et.al.:Int.Immunol, 10: 1563 ~1572, 1998, Nishimura, H. et.al.:Immunity, 11: 141~151, 1999)や、並張性筋症(BALB/c遺伝子背景)(Nishimura, H. et.al.:Science,291: 319~322, 2001)を発症することから、PD-1が自己免疫疾患発症の、特に末梢自己免疫対応の制御因子であることが明らかとなった。

発明の開示

25 PD-1は様々な自己免疫疾患の制御因子であり、自己免疫疾患の原因遺伝子の一つであると考えられる。PD-1の機能を制御することにより、免

疫機能の低下または亢進、感染症、移転時の拒絶反応、腫瘍等の治療や診断を行えると考へて、銳意検討を重ねた結果本発明者はPD-1の機能を制御する物質に係る本発明に到達した。

免疫を司るリンパ球への刺激は主にT細胞の場合T細胞受容体（TCR）を、B細胞の場合B細胞受容体（BCR）を介し伝わり、その分子機構には細胞内リン酸化反応が重要な役割を担っている。

PD-1が免疫系においてリンパ球や骨髓系細胞等様々な免疫担当細胞を負に制御していることが明らかとなり、またPD-1の細胞内領域にITIM（Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif）を有することから、本發明者らは、PD-1の抑制性シグナル伝達における分子機構は脱リン酸化酵素のリクルートと考えた。従って、TCRやBCRの近傍にPD-1を位置させることによって、PD-1の機能を発現させることができると考えるに至った。本発明者らは、PD-1とTCRあるいはBCRを癒合した物質によってPD-1の抑制性シグナルが伝わることを確認し、本発明を完成した。

本発明者らは、まず抗PD-1抗体と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体を用いて上記の考へが正しいことを確認した。CD3とはT細胞に発現する膜タンパクであり、TCRを構成する複合体の一つである。抗PD-1抗体と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体を架橋し、2価抗体を作製した。本発明では、この2価抗体をハイブリッド抗体と呼ぶ。本ハイブリッド抗体は、本発明者により初めて作製されたものである。

また、この本ハイブリッド抗体で2種の受容体を架橋することによりシグナルが伝達するとの知見も、今回初めて得られたものである。
すなわち本発明は、
1. PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質、
2. PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜

タンパクを認識する物質およびリンカーからなる2価物質である前記1記載の物質、
3. 膜タンパクが、T細胞膜またはB細胞膜に存在するタンパクである前記1または2に記載の物質、

5. PD-1を認識する物質、T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質およびリンカーからなる前記1または2に記載の物質、
5. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々2から5量体である前記1乃至4のいずれかに記載の物質、
10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が抗体である前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
7. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が、抗体のF_ab部分である前記6のいずれかに記載の物質、
8. リンカーが有機化合物からなる前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
15. 9. リンカーがペプチドからなる前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体チドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
11. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む複数のペプチドで構成される前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
20. 12. PD-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、各々ペプチドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
13. 前記1に記載の物質を、PD-1が関与する疾患の治療およびまたは予防に有効な含有する薬学的組成物、
25. 14. 疾患が神経変性疾患、自己免疫疾患、臓器移植片拒絶反応、腫瘍および感染症からなる群から選ばれる疾患である前記1-3に記載の薬学的組成物、

15. 神経変性疾患が、バーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マシャドジエセフ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病からなる群から選ばれる前記 1.4 に記載の薬学的組成物、および
16. 自己免疫疾患が、糸球体腎炎、間筋炎、クローン病、全身性エリマーティーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾鱗、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ペーチェット病および橋本病からなる群から選ばれる前記 1.4 に記載の薬学的組成物に關する。
- 10 本発明で言う PD-1 を認識する物質とは、特異的に PD-1 を認識する物質であれば良く、例えば、抗 PD-1 抗体、抗 PD-1 抗体の断片、PD-1 自体、PD-1 の断片、PD-1 のリガンド (PD-1L1 (Freeman, G.J. et al.: J.Exp.Med., 192: 1027-1034, 2000) 、PD-1L2、PD-H3) 、それらの断片、低分子有機化合物等が挙げられる。
- 15 より具体的には、2001年5月30日付で日本国茨城県つくば市東工丁目1番地1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに第 FIRM P-18356 号として寄託され、2002年7月16日付で、国際寄番号 FERM BP-8118 として国際寄託に移管されている「J43」と命名したハイブリドーマが產生する抗 PD-1 抗体である。
- 20 好ましくは、この抗体の Fab 部分であるが、これに限定されるものではない。
- 本発明で言う PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質とは、特異的にその膜タンパクを認識する物質であれば良く、例えば、T 細胞上に発現する T 細胞受容体 (TCR) を構成する複合体 (TCR 複合体) 等、B 細胞上に発現する B 細胞受容体 (BCR) を構成する複合体 (BCR 複合体) 等を特異的に認識する物質を意味し、例えば、TCR 構合

- 複合体を構成するタンパクの断片、抗 TCR 抗体、抗 TCR 抗体の断片、BCR 複合体を構成するタンパクの断片、抗 BCR 抗体、抗 BCR 抗体の断片等が挙げられる。
- 好ましくは、抗 TCR 抗体の Fab 部分、抗 BCR 抗体の Fab 部分であるが、これに限定されるものではない。
- 抗 TCR 抗体および抗 BCR 抗体は、市販されているものを使用することができます。例えば、抗 TCR 抗体としては、抗 CD3 抗体 (α -CD3 mAb, Pharmingen 社製) 、抗 BCR 抗体としては、抗 IgG (H+L) ポリクローナル抗体 (Zymed 社製) が入手可能である。
- 10 本発明で言うリンクマーとは、上記の PD-1 を認識する物質および PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質を適切な距離を保つて繋ぐことができるものでなければ特に限定されない。より具体的には、ペプチド、アミド等が挙げられる。
- 15 リンカーハ、市販されているものを使用することができ、例えば、フェニレンジアミド (Phenylenedimaleimide, Aldrich 社製) が入手可能である。本発明の主体である PD-1 に対する特異性を有する物質は、例えば以下のようにして作製することができる。
- PD-1 を特異的に認識する物質として抗体を選び、PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパク (以後、単に膜タンパクと省略する。) を特異的に認識する物質も抗体であるが、本発明では、ハイブリッド抗体と呼ぶ。このハイブリッド抗体の作製法について説明する。
- (1) PD-1 あるいは膜タンパクを免疫抗原として、動物に感作し、(2) 感作動物の脾細胞と感作動物由來のミエローマ細胞を細胞融合し、(3) 得られたハイブリドーマより、感作抗原 (PD-1 あるいは膜タンパク) に対するモノクローナル抗体を産生する細胞をスクリーニングし、
25 (4) 目的とする抗体産生ハイブリドーマをクローニングし、

- (5) クローン化された抗体産生ハイブリドーマを増殖させ、
 (6) 產生された抗体を分離精製し、
 (7) 得られた抗PD-1抗体と抗膜タンパク抗体をリンカーで架橋して作製することができる。

5 あるいは、(8) F(ab')₂を得るため、更にペプシン処理をし、分離精製、

(9) 固製したそれぞれのF(ab')₂を退元し、分離精製し、

- (10) 固製したそれぞれのF(ab')₂をリンカーで架橋して作製することができる。

10 PD-1とPD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパク(膜タンパク)をそれぞれ特異的に認識する物質として、両方あるいは片方が低分子有機化合物である場合は、

- (11) 上記の手法で作製した抗体を用い、それぞれの抗原であるPD-1あるいは膜タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することによりその結合を阻害する低分子を見出し、
 (12) その低分子同士あるいは抗体またはFabをリンカーによって架橋して作製することができる。

15 その結合を阻害する低分子を見出し、

- (13) 上記の手法で作製した抗体を用い、それらの抗原であるPD-1あるいは膜タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することにより

15 その結合を阻害する低分子を見出し、

- (14) 上記の手法で作製した抗体を用い、それらの抗原であるPD-1あるいは膜タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することにより

20 その結合を阻害する低分子を見出し、

- (15) 上記の手法で作製した抗体を用い、それらの抗原であるPD-1あるいは膜タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することにより

25 その結合を阻害する低分子を見出し、

37°Cでポリエチレン glycole(好ましくは、PEG4000)を加えることによって行なわれる。マウスミエローマ細胞にはP3×63Ag8、P3/NS1/1-Ag4-1、SP-2/0-Ag-14など数種類が知られており、いずれも容易入手可能である。

5 ミエローマ細胞はHAT培地(ヒボキサンチン、アミノブテリノおよびチミジンを含む培地)では生存できないHGPRT(ヒボキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランسفュラーゼ)欠損細胞株が有用であり、さらにミエローマ細胞自身が抗体を分泌しない細胞株であることが望ましい。好適にはSP-2/0-Ag-14が用いられる。

10 次に、得られた細胞融合の混合物を、低細胞密度で96マイクロウェルプレートに分注し、HAT培地で培養する。1~2週間の培養で未融合のミエローマ細胞、ミエローマ細胞同志のハイブリドーマ、さらに未融合の脾細胞、脾細胞同志のハイブリドーマは生存条件が満足されないため死滅し、脾細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが増殖していく。

15 (3) のスクリーニングは、ハイブリドーマ培養上清と固相化した抗原を反応させ、抗原に特異的に吸着した上清中の抗体を、標識された第2抗体を用いて定性することによって、PD-1あるいは膜タンパクに対する抗体を產生しているハイブリドーマか否かを判定する。

(4) の工程は、抗体産生ハイブリドーマを軟寒天培養法(Monoclonal Antibodies, 372 (1980))に従ってクローニングすることによって行なわれる。この際、限界希釈法を用いることも可能である。

- 20 (5) の工程は、クローン化されたハイブリドーマを通常の培地で培養し、その培養上清から分離精製することにより得られるが、より大量の抗体を効率よく得るにはハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、増殖させ、その腹水中より分離精製する方法が用いられる。

(6) の工程は、通常の方法、例えば搾取、イオン交換クロマトグラフィー、

グルコロ、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーカロマトグラフイーなどにより精製できるが、より効果的にはプロテインA-セファロースCCL-4B（マッシュバイオサイエンス社製）を用いたアフィニティーカロマトグラフイーが用いられる。

本発明のハイブリッド抗体は、PD-1を特異的に認識するので、PD-1の精製および濃縮、例えばアフィニティーエンソス社製）を用いたアフィニティーカロマトグラフイーなどに利用することができる。

(7) の工程は、架橋剤として、例えばスルフルオーリーEMCS (N-(6-アミド基またはSH(メルカプト)基に結合させることで架橋できる。どちらか一方の抗体をまず sulfo-EMCS とアミド基を有するアミドカルボン酸などで還元した他の抗体のSH(メルカプト)基と最初の抗体に結合した sulfo-EMCS のアミド基を反応させ、グルコロで2種の抗体同士が架橋されたものを分取する。

(8) の工程は、工程 (6) で得られたそれぞれの抗体にペプシンを加え、37℃で48時間消化する。ペプシン消化された $F(a'b')_2$ の分離精製には、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、グルコロ、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーカロマトグラフイーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いたグルコロが用いられる。

(9) の工程は、 $F(a'b')_2$ に2-メルカプトエタノールを加え、30℃で30分間還元する。還元された $F(a'b')_2$ の分離精製には、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、グルコロ、疎水性クロマトグラフイー、アフィニティーカロマトグラフイーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200を用いたグルコロが用いられる。

(10) の工程は、一方の抗体の $F(a'b')_{2H}$ 画分にリンカーを結合させる。架橋剤として $F(a'b')_{2H}$ のメルカプト(SH)基に結合できるものであれば良く、例えばフェニレンジマレイミドを加え、室温で30分間反応させる。次に、他方の $F(a'b')_{2H}$ を1.3倍量加え、室温で4時間反応させる。得られる2価の特異性を有する物質の分離精製は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーカロマトグラフイーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200を用いたグルコロが用いられる。

(11) の工程は、工程 (6) で得られた抗体をそのまま用いるか、常法により適当に標識（例えばビオチン化酵素、FITC標識等）して用いることができる。ELISA法を用いる場合は、常法により抗原を固相化し、抗体を添加する。次に酵素標識した2次抗体、ビオチン化標識した抗体を用いる場合は、酵素標識したストレートアビジョンを添加した後、抗体と抗原との特異的結合を、クロモフォー産生物質存在下で吸光光度計により測定する。このアッセイ系を用いることによって、PD-1あるいは膜タンパクを特異的に認識する低分子が得られる。

(12) の工程は、片方が抗体あるいは $F(a'b')$ に適当な官能基を導入することで、抗体あるいは $F(a'b')$ と結合させることができる。例えば、マレイミド基を導入すれば、抗体あるいは $F(a'b')$ のメルカブト(SH)基に結合させることが可能である。また、低分子同士であれば、両物質を含む分子を合成することが可能である。

PD-1を特異的に認識する物質として抗体を、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを特異的に認識する物質としても抗体を選び、これらを一つのペプチド中に含有する物質を本発明では、バイオペシフィック抗体と呼ぶ。このバイオペシフィック抗体の作製法について説明する。

(1) 抗PD-1抗体および抗膜タンパク抗体產生ハイブリードーマから抗体

遺伝子を単離し、

(2) 抗P D—1抗体遺伝子の可変領域と抗原タンパク抗体遺伝子の可変領域をリンクするDNAを用いて連結し、連結したDNA断片を発現ベクターに組み込み、細胞に発現ベクターを導入して増殖させ、

5 (3) 產生されたタンパクを分離精製してバイオスペシフィック抗体を作製することができる。

より具体的に各ステップを説明すると以下のようになる。

(1) の工程は、ハイブリドーマ細胞からRNAを単離し、抗体遺伝子またはその部分ペプチドをコードするcDNAを単離する工程からなる。

10 ハイブリドーマ細胞から全RNA (total RNA) またはmRNAを単離する工程は、公知の方法 (以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular C

loning (Sambrook, J., Fritsch, E. F.およびManiatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989年に発刊) または Current Protocol in Molecular Biology (F.M.Ausubel 編, John Wiley & Sons, Inc. より発刊) に記載の方法) 15 に従って行うことができる。

本発明の抗体遺伝子またはその部分ペプチドをコードするcDNAのクローニングの手段としては、本発明の抗体タンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCR法と略称する。) によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだcDNAを本発明の抗体タンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は公知の方法に従って行うことができる。抗体遺伝子は、全RNA (total RNA) またはmRNAを用いて直接、逆転写酵素によるマス

25 連鎖反応 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; 以下、RT-PCR法と略称する。) によって増幅することもできる。

(2) 本発明のバイオスペシフィック抗体を取得する方法としては、

i) ペプチド合成する方法、または
ii) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的にはii) に記載した方法が好ましい。

5 遺伝子組み換え技術を用いてペプチドを生産するための発現系 (宿主ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えは、大腸菌で発現させる場合には、例えは、配列番号28で示される塩基配列の5末端に開始コドン (ATG) を付加し、得られたDNAを、適当なプロモーター (例えは、trpプロモーター、lacプロモーター、λ PLプロモーター、T7プロモーター等) の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター (例えは、pBR322、pUC18、pUC1.9等) に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌 (例えは、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等) を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするペプチドを得ることができる。また、ベクテリアのシグナルペプチド (例えは、pET1Bのシグナルペプチド) を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするペプチドを分泌することもできる。さらに、他のペプチドとのフュージョン・プロテイン (fusion protein) を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えは、配列番号28で示される塩基配列を適当なベクター (例えは、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等) 中の適当なプロモーター (例えは、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオニンプロモーター等) の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞 (例えは、

- サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスJ細胞、293T細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その培養液中に目的とするペプチドが分泌される。大腸菌を形質変換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), vol. 69, 5 2110 (1972)や Gene, vol. 17, 107 (1982)などに記載の方法に従って行うことができる。
- 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験アロトコール, 263 (秀構社より 1995 年に発行) や Virology, vol. 52, 456 (1973)などに記載の方法に従って行うことができる。
- 10 遺伝子組み換え技術を用いて直接バイオセシフイック抗体を作製する技術が知られている。例えば、Alt ら、FEBS Letter, vol. 454, 90 (1999)によつて、癌胎兒抗原および大腸菌β-ガラクトトシダーゼに対するペイオセシフイック抗体(シングルチェーンダイアボティーと呼ばれる。)の作製が報告されてい。15 破断片は同一鎖上の 2 つの連続したドメイン間で対合するには短すぎぎるリンクマーによって一方の重鎖可変ドメイン (VH) と他方の軽鎖可変ドメイン (VL) が連結されている。そのため、該断片の VH および VL ドメインは、別の断片の相補的 VL および VH ドメインと対合することを余儀なくされ、それにより 2 つの抗原結合部位を形成する。
- ペプチドンカーラーは 3-12 アミノ酸残基が好ましいが、配列は特に限定されない (Hudson ら、J. Immunol. Met., vol. 231, 177 (1999))。
- (3) 以上のようにして得られたペプチドは、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどにより精製できる。
- 本発明のバイオセシフイック抗体もまた、PD-1 を特異的に認識するので、PD-1 の精製および濃縮、例えばアフィニティーコロマトグラフィーなどに利用することができる。
- 25 くは、静脈内投与) されるか、または 1 日 1 時間から 2~4 時間の範囲で静脈

産業上の利用可能性
〔医薬品への適用〕

本発明の PD-1 に対し特異性を有する物質の最大かつ重要な利用方法は下記の疾患の治療に用いることである。

- 5 本発明の PD-1 に対し特異性を有する物質は、例えば、神経愛性疾患(ペーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンントン病、マシャド・ジエセフ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病等)等の疾患の治療および/または予防に有用である。
- また、本発明の PD-1 に対し特異性を有する物質は、PD-1 が関与し、免疫反応が亢進することによる疾患、例えば、自己免疫疾患(systemic lupus erythematosus、関節炎、抗原性心筋症候群疾患、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローゼン病、全身性エリテマトーデス、慢性關節リウマチ、多発性硬化症、乾燥、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ベーチェット病、橋本病等)、臓器移植拒絶反応、アルギー等の疾患の治療および/または予防に有用である。
- また、本発明の PD-1 に対し特異性を有する物質は、PD-1 が関与し、免疫反応が低下することによって引き起こされる疾患、例えば、腫瘍、感染症等の疾患の治療および/または予防に有用である。
- 20 本発明の PD-1 に対する特異性を有する物質を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人人あたり、1 回につき、0.1 mg から 100 mg の範囲で、1 日 1 回から数回経口投与されるか、または成人人あたり、1 回につき、0.01 mg から 30 mg の範囲で、1 日 1 回から数回非経口投与(好まし

内に特異投与される。

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ないと直で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

5 本発明化合物を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、生剤等として用いられる。

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

10 このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質がそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（糊精グリコール酸カルシウム等）、滑流剤（ステアリン酸マグネシウム等）、

15 安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

20 経口投与のための内服用液剤は、薬剤的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、懸濁剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。

5 ポリエチレングリコール、エタノールのようないわゆるアルコール類等および溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、ブロビングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようないわゆるアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造、貯蔵される。また無菌の固形剤、例えば滅菌乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

10 非経口投与のための、その他の製剤としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、軟膏剤、塗布剤、吸入剤、スプレー剤、坐剤および體内投与のためのペッサリー等が含まれる。

15 スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号に詳しく述べている。

20 PD-1は、免疫反応に関与していることから、本発明のPD-1に対する特異性を有する物質を用いて、PD-1の発現を測定することによって、免疫反応に関与する物質のスクリーニング等にも利用することができる。

[発明の効果]

本発明のPD-1に対する特異性を有する物質は、PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびそれらを繋ぐリンカーからなり、PD-1および膜タンパクを特異的に

認識し、PD-1シグナルを伝達することができた優れた物質である。

図面の簡単な説明

図1は、抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体のFACS解析を

示す。

図2は、活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体の効果を示す。

図3は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体による抗BCR抗体刺激に対するIL-2産生抑制効果を示す。

図4は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体による抗BCR抗体刺激後のSHP-2動員効果を示す。

図5は、J41-2C11ペイスペシフィック抗体表現プラスマミドJ43-2C11seD_b-pSechygroBを示す。

図6は、活性化マウス脾臓T細胞のIFN- γ 産生に対するJ43-2C11ペイスペ

シフィック抗体の効果を示す。

発明を実施するための最良の形態
以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

抗PD-1抗体と抗T細胞受容体抗体をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体、抗PD-1抗体と抗BC細胞受容体抗体をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BCRハイブリッド抗体と記述する。また、抗PD-1抗体のF_ab_H画分と抗T細胞受容体抗体のF_ab_H画分をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗TCR

ハイブリッドF_ab抗体、抗PD-1抗体のF_ab_H画分と抗BC細胞受容体抗体のF_ab_H画分をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BC

RハイブリッドF_ab抗体と略記する。

実施例1

- (1) 抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体の調製
 - 5 (1-A) 抗マウスCD3εモノクローナル抗体のマレイミド化抗マウスCD3εモノクローナル抗体をリン酸ナトリウム(0.1M, pH7.0)、NaCl(50 mM)で置換した後、200倍量のsulfo-EMCS(同仁化学研究所製)を加え、20℃で1時間反応させた。その後、セファクリルS-300[「リン酸ナトリウム(0.1M, pH7.0)」]を用いてゲルろ過を行
 - 10 い、280 nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。また、同時に280 nmの吸光度からタンパク量も算出した。

- (1-B) 抗PD-1抗体の還元
 - マウスPD-1に対するモノクローナル抗体(国際登録番号 PCT/JP98/01818として、国際寄託されている「J43」)と命名したハイブリドーマが產生する。)をリン酸ナトリウム(0.1M, pH6.0)で置換した後、2-メルカプトエチルアルミニン(終濃度10 mM)、EDTA(終濃度1 mM)を加え、37℃で90分間還元した。セファクリルS-300[「リン酸ナトリウム(0.1M, pH6.0)」]を用いてゲルろ過を行い、280 nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(シングルチェーン画分)。
 - 15 20 た、同時に280 nmの吸光度からタンパク量も算出した。
- (1-C) マレイミド化抗マウスCD3εモノクローナル抗体と還元抗PD-1抗体の架橋
 - マレイミド化抗マウスCD3εモノクローナル抗体と還元抗PD-1抗体を1:4の割合で混合し、15℃で18時間反応させた。その後、セファクリルS-300[「リン酸ナトリウム(0.1M, pH7.0)」]を用いてゲルろ過を行
 - 25 い、280 nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。また、

同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2) 抗PD-1／抗TCRハイブリッドF_{a b}抗体の調製

(2-A) 抗PD-1抗体のF_(a b')画分の調製

マウスPD-1に対するモノクローナル抗体(国際特許登録号 PCT/JP98-8118
5 として、國際審査されている「J43」と命名したハイブリドーマが產生する。)をペプシン-バッファー〔酵母ナトリウム(0.1M, pH4.5)、NaCl
1 (0.1M)〕に置換したのち、ペプシン(終濃度0.2mg/mL)を加え、3

7°Cで48時間消化した。その後セファクリルS-200〔Tris-HCl
1 (0.2M, pH8.0)、EDTA (1.0mM)〕を用いてゲルろ過を行った。
10 280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(F_(a b')
・画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-B) 抗PD-1抗体のF_{a b sh}画分の調製

F_(a b')画分に2-メルカプトエタノール(終濃度2.0mM)を加え、
30°Cで30分間還元した。氷冷したのち、セファクリルS-200〔酵母
15 ナトリウム(5.0mM, pH6.3)、EDTA (1mM)〕を用いてゲルろ過
を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(F_{(a b sh}画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-C) 抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF_(a b')画分の調製

抗マウスCD3εモノクローナル抗体(Pharmingen社製)をペプシン-バ
10 ファー〔酵母ナトリウム(0.1M, pH4.5)、NaCl (0.1M)〕に置換した
のち、ペプシン(終濃度0.2mg/mL)を加え、37°Cで48時間消化した。

その後セファクリルS-200〔Tris-HCl (0.2M, pH8.0)、ED
15 TA (1.0mM)〕を用いてゲルろ過を行った。280nmの吸光度をモニ
ターし、主要ピーク画分を分取した(F_(a b')画分)。また、同時に2
20 80nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-D) 抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF_{a b sh}画分の調製

μL マウス血清、及び $4\text{ }\mu\text{L}$ のハイブリッド抗体 ($2\text{ }\mu\text{g}$) を添加し、 30 分間水上で静止した。PBS (−) で、1回洗浄し、二次抗体をそれぞれ $2\text{ }\mu\text{L}$ ($1\text{ }\mu\text{g}$) 添加し、FACSベッファーで最終的に $100\text{ }\mu\text{L}$ にフィルアップ (fill up) し、 30 分間水上で静止した。その後、FACScanを用いて解析を行った。その結果を図1に示す（なお、以下の図において、ハイブリッドF_ab抗体をHFAbと記す。）。

作製した抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体が実際に細胞表面抗原に反応するかどうかを FACScan (ベクトンディキンソン製) を用いて、解析した結果、それぞれの表面抗原に反応することを確認できた。

実施例3：活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体の効果

(A) 腹膜T細胞の調製
BALB/cマウスから脾臓を摘出し、赤血球を溶血させた後、PBS (−) $\times 10^8$ cells/ mL 。さらに培地により平衡化されたT細胞分離用ナイロンファイバーカラム (Wakol製) を用いてT細胞の単離調製した。

(B) 活性化脾臓T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体の効果

96 wells 11プレートを $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CD3抗体 (クローン名KT3、Immunotech製) を 37°C で3時間コートする。培養したT細胞 (2×10^6 cells/ $\text{wells} 1\text{ s}/200\text{ }\mu\text{L}$) に、抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体 (0.03, 0.1, 0.3, 1, $3\text{ }\mu\text{g}/100\text{ mL}$) を加え、 CO_2 インキュベーター内 (37°C) で培養した。72時間後に回収した培養上清中のサイトカイン (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10) の濃度をアッセイキット (R&D system製) を用いて測定した。

クローン名KT3、Immunotech製) を 37°C で3時間コートする。培養したT細胞 (2×10^6 cells/ $\text{wells} 1\text{ s}/200\text{ }\mu\text{L}$) に、抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体 (0.03, 0.1, 0.3, 1, $3\text{ }\mu\text{g}/100\text{ mL}$) を加え、 CO_2 インキュベーター内 (37°C) で培養した。72時間後に回収した培養上清中のサイトカイン (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10) の濃度をアッセイキット (R&D system製) を用いて測定した。

その結果は図2に示す通りであり、 $3\text{ }\mu\text{g}$ の抗PD-1/抗TCRハイブリッドF_ab抗体を用いたときの72時間後において、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のどちらの刺激において IFN- γ 、IL-4、IL-10 の產生を優位に抑制するという結果を得た。

5

実施例4：抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体の調製

- (A) 抗PD-1抗体のF_(a b')：画分の調製
マウスピD-1に対するモノクローナル抗体 (実施例1で用いたものと同じ抗体) をペプシンペッファー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH 4.5)、NaCl 10 (0.1M)] に置換したのち、ペプシン (SIGMA製) (終濃度 $0.2\text{ mg g}/\text{mL}$) を加え、 37°C で $4\text{--}8$ 時間消化した。その後セファクリルS-200 (AmashamPharmacia製) [Tris-HCl (0.2M, pH 8.0)、EDTA (10 mM)] を用いてゲルろ過を行った。 280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F_(a b')：画分)。また、同時に 280 nm の吸光度からタンパク質量も算出した。
- (B) 抗PD-1抗体のF_{a b sh}：画分の調製
F_(a b')：画分に2-メルカプトエタノール (終濃度 2 mM) を加え、 30°C で 30 分間還元した。水冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸ナトリウム (5.0 mM, pH 6.3)、EDTA (1 mM)] を用いてゲルろ過を行い、 280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F_{a b sh}：画分)。また、同時に 280 nm の吸光度からタンパク量も算出した。
- (C) 抗IGG (H+L) ポリクローナル抗体のF_(a b')：画分の調製
ウサギ抗マウスIgG (H+L) ポリクローナル抗体 (Zymed社製) をペプシンペッファー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH 4.5)、NaCl (0.1M)] に置換したのち、ペプシン (終濃度 $0.2\text{ mg g}/\text{mL}$) を加え、 37°C で $4\text{--}8$ 時間消化した。その後セファクリルS-200 [Tris-HCl (0.2M, pH 8.0)] で 280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F_(a b')：画分)。

H₈0)、EDTA (10 mM)】を用いてゲルろ過を行った。280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F_{a b'})₂画分)。また、同時に280 nm の吸光度からタンパク量も算出した。

(D) 抗IgG (H+L) ポリクローナル抗体のF_{a b sh}画分の調製

F_{a b'}₂画分に2-メルカプトエタノール (終濃度20 mM) を加え、30°Cで30分間還元した。氷冷したのち、セファクリルS-2000【酢酸ナトリウム (50 mM, pH 6.3)、EDTA (1 mM)】を用いてゲルろ過を行い、280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。(F_{a b sh}画分)。また、同時に280 nm の吸光度からタンパク量も算出した。

(E) 抗PD-1抗体のF_{a b sh}画分と抗IgG (H+L) ポリクローナル抗体のF_{a b sh}画分の架橋

PD-1に対する抗体J43のF_{a b sh}画分にフェニレンジマレイミド (Aldrich型) (終濃度4 mM) を加え、室温で30分間反応させ、これをJ43 F_{a b sh}画分とした。J43 F_{a b sh}画分及び抗IgG (H+L) ポリクローナル抗体のF_{a b sh}画分を1:13の比で加え、室温で4時間反応させた。次にTris-HCl (1M, pH 8.0) を適量加えることで反応溶液のpHを8.0にし、2-メルカプトエタノール (終濃度20 mM) を加え、30°Cで30分間反応させた。ヨードアセトアミド (SIGMA型) (終濃度2.5 mM) を加え、遮光下、室温で10分間反応させた。最終的に、セファクリルS-200 (酢酸ナトリウム (50 mM, pH 6.3)、EDTA (1 mM) を用いてゲルろ過を行い、280 nm の吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (B_{a b}画分)。また、同時に280 nm の吸光度からタンパク量も算出した。

(F) 実施例5：B細胞株に対する抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_{a b}抗体の効果

(A) マウスPD-1を強制発現させたA2011A1. 6 (B細胞株) の作製

(1) マウスPD-1発現プラスミドの作製

Eco RIで切り出したmPD1-f1a gのDNA断片を、市販の発現ベクターのEco RIサイトに組み込み、発現プラスミドmPD1-pAを構築した。

(2) トランスフェクション

1×10⁷個のA2011A1. 6を325 μlの氷希した15%FCSを含む RPMIに懸濁した培液とScal I処理により直鎖状にしたPD-1発現プラスミドを10 μlの蒸留水に懸濁した溶液をエレクトロポレーション用のキュベット (Gene Pulser Cuvette 0.4 cm electrode gap, 50, BIORAD) に添加し、250 V/960 uF (Gene Pulser, BIORAD) の設定で電圧をかけた。その後、10分間、室温で静置し、30 mlの培地 (RPMI 1640 中に10%FBS, 50 uM 2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む) に懸濁し、さらに30倍希釈し、96 wellプレート10³個/100 μl/wellで分注した。

48時間後からファイナル (final) 3 μMのプロマイシンで選択を開始し、マウスPD-1発現細胞株を樹立した。

(B) マウスPD-1を強制発現させたA2011A1. 6に対する抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_{a b}抗体の効果

マウスPD-1を強制発現させたA2011A1. 6を96 wellプレートに播種した (5×10⁴個/100 μL)。抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_{a b}抗体 (0, 1, 3, 10 μg/100 μL) を加えて10分後、抗マウスIgG (H+L) F_{a b'}₂ (Zymed社製) (終濃度0.3, 1, 3 μg/ml) を100 μl分注して、CO₂インキュベーター内で12時間培養した。培養上清を回収し、培養上清中の1 L-2の濃度をマ

ウス (mouse) 1 L-2アッセイキット (R&G system製) を用いて測定した。その結果を図3に示す。

抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体及び抗BCR抗体F (a'b')₂の投与量 (dose) を変えて検討した結果、抗BCR抗体F (a'b')₅の濃度にかかわらず、全ての場合において、ハイブリッドF_ab抗体において抑制効果が見られた。

(C) SHP-2動員の確認

- 3×10^6 cells / 100 μLのマウスPD-1強制発現A2011
A1. 6 (B細胞株) に抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体 (0、
10、1、3、10 μg / 100 μL) を加えた。10分後、抗マウスIgG (H
+L) F (a'b')₂ (終濃度 0.3、1、3 μg / mL) を100 μL添加し、
5分間室温で反応させた。遠心して上清を除去した後、細胞を200 μLの
ライシス・バッファ (lysis buffer) (組成: Trit_s-HCl (20 mM, pH
7.4)、Na₂EDTA (1 mM)、EGTA (1 mM)、
15 mM)、1% Triton-X100、ピロリン酸ナトリウム (2.5 mM)、β-ゲ
セロリンナトリウム (1 mM)、Na₃VO₄ (1 mM)、ロイペプチド (1
μg / mL)、PMSF (1 mM)) に懸濁し、氷上に静置した。30分後、
遠心して上清を回収し、200 μLのプロテインGセファロースビーズ (アマ
シャムバイオサイエンス社製) を加え、4℃で30分間反応させた。遠心し
て上清を回収し、あらかじめ抗FLAG抗体 (SIGMA製) を結合させておい
たプロテインGセファロースビーズを20 μL添加し、4℃で一晩混合させ
た。
- ビーズを400 μLのライシス・バッファで5回洗浄したのち、20 μL
のライシス・バッファ及び20 μLの2×SDSサンブルバッファを添加し、
100℃で5分間煮沸した。遠心によりビーズを除去して、うち15 μLを
4-20% SDS-PAGEアカリアルミドゲル電気泳動する。泳動後、ゲルをブ

ロッティングバッファに置換してから、PVDF膜 (BIO RAD製) に転写し
た。転写後、膜を室温で1時間ブロック・エース (Block Ace) (大日本製薬
製) でブロッキングした。

- 200倍に希釈した抗SHP-2抗体 (SANTA CRUZ製) を、室温で1時
間反応させた後、TBS-Tで10分間、3回洗浄した。その後、2000倍に
希釈されたHRP標識抗ラビット (rabbit) IgG抗体 (アマシャムバイオサイ
エンス社製) を室温で1時間反応させた後、TBS-Tで10分間、3回洗
浄した。最終的にECLプラス・ティエクション・キット (ECL plus detection
kit) (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて発光させ、ルミノイメー
ジャーLAS1000プラス (plus) (FUJI Film製) で解析した。
- 抗PD-1/抗BCRハイブリッドF_ab抗体が、抗BCR抗体刺激から
のIL-2産生を抑制するという結果から、その効果が、脱リン酸化酵素S
HP-2のPD-1のITIMへの動員によるものかどうかを証明するため
に評価を行った。図4に示すように、PD-1の量をコントロールとし、サ
ンプル量を調節し、SHP-2の動員を定量した結果、コントロールハイブ
リッド抗体に対し、1及び10 μgにおいて、明らかにSHP-2の動員が
確認された。
- 実施例6：抗マウスPD-1抗体J4-3のcDNAクローニング
20 (1) 抗マウスPD-1抗体J4-3の調製
37℃、5% CO₂条件下、抗マウスPD-1抗体產生ハイブリドーマ (J
4-3) を、Hybridoma SFM 培地 (イシビトロジェン製) で培養し、数日後へ
イブリドーマの培養上清を回収した。回収した培養上清より、HiTrap Protein G
(アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて、1 g画分を精製した。
- (2) ベブチドシークエンス
J4-3 IgGを1.0-2.0% SDS-PAGEアカリアルミドゲル電気泳動し、
25

泳動後のゲルから I g G を P V D F 膜 (バイオラット型) に電気的に転写した。転写された膜をクマシーカラム染色し、J 4 3 I g G 酶剤を含む膜を切り取り、ペプチドシークエンサー-Procise492 (アブライドバイオシステムズ製) を用いて、脛筋のアミノ末端の配列 1 5 残基を決定した (配列番号 1)。

5 (3) RNA の抽出

5×10^9 個のハイブリドーマを 1 mL の TRIzol (インビトロジェン製) で溶解した。以下の操作は添付に従い、全 RNA (total RNA) を調製した。さらに調製した全 RNA (total RNA) より、Oligotex-MAG mRNA Purification kit (宝酒造製) を用いて、mRNA を精製した。

10 (4) 脣筋 c DNA のクローニング (3' RACE)

ペプチドシークエンスにより決定した脣筋のアミノ末端の配列 (YELTQPPSASVNVGE) より組成プライマー (プライマー No.1) を設計した。³'Full RACE Core Set (宝酒造製) を用いて、以下に示した反応条件により、3' RACEを行った。

15 プライマー No.1

5'-ta(cgt) gg(gtg) ct(gtatc) ac(gtatc) cc-3' (配列番号 2)

1) 第1鎖 (First strand) c DNA の合成

20 1.0 × RNA ポリメラーゼ逆転写法 (PCR) バッファ

J 4 3 m RNA (5.0 ng / μ L)

塩化マグネシウム (2.5 mM)

d NTP 混液 (各 1.0 mM)

AMV 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) XL (5 U / μ L)

Oligo dT-3'sites Adapter プライマー (2.5 pmol / μ L)

リボヌクレアーゼ (RNase) 阻害剤 (4.0 U / μ L)

$\frac{\text{dH}_2\text{O}}{\circ}$ 7.5
15 μ L

30°C 10 分 → 50°C 30 分 → 95°C 5 分 → 4°C 5 分

5 2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

第1鎖 (First strand) c DNA 1
プライマー No.1 (2.0 pmol / μ L) 1
アンカープライマー 1

dH_2O 2.2
One shot LA PCR Mix (商品名) 2.5
 50μ L

95°C 5 分 → (94°C 20 秒、50°C 20 秒、72°C 60 秒) \times 30 サイクル

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を 1% アガロースゲル電気泳動後、

ゲルを Et Br 染色した。ゲルから DNA 断片を MinElute Gel Extraction Kit (キヤゲン製) を用いて回収し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて、

回収した DNA 断片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結されたプラスミドを用いて、大腸菌 DH 5 α を形質転換させた。最終的に、大腸菌よりプラスミドを精製して、J 4 3 I g G 酶 c DNA の塩基配列を決定した (配列番号 3)。c DNA から推定されるアミノ酸配列を配列表に示す (配列番号 4)。

25 (5) 脣筋 c DNA のクローニング (5' RACE)

5' RACEを行うために、既報のハムスター I g G 脣筋 c DNA 配列情報 (GenBank Accession No.U17166) に基づき、定常領域のプライマーを設計

した。⁵'Full RACE Core Set (宝酒造製) を用いて、以下に示した反応条件により、5' RACEを行った。

| | | |
|------------|--|----------|
| プライマー No.2 | 5'-ccg agg tca gga gtt gg-3' (5' リン酸化処理) | (配列番号 5) |
| プライマー No.3 | 5'-tgc acc agg cat ccc agg gtc-3' | (配列番号 6) |
| プライマー No.4 | 5'-cgf agg ctg gaa ctc tgg agg c-3' | (配列番号 7) |
| プライマー No.5 | 5'-agg ttg tgc tgt cac agg cag-3' | (配列番号 8) |
| プライマー No.6 | 5'-tgt acac cct tcc cat ctt tcc t-3' | (配列番号 9) |

| | | |
|-------|---|--|
| 1) | 第1鎖 (First strand) c DNAの合成 | |
| J 4 3 | 全RNA (total RNA) ($2 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) | |
| 1.0 | × RNAポリメラーゼ逆鎖反応 (PCR) リボヌクレアーゼ (RNase) 阻害剤 (40 U/ AMV 逆転写酵素(Reverse Transcriptase) XL (1 プライマー No.2 (100 pmol / μL) dH_2O | |
| 30 | 0°C 10分 → 50°C 40分 → 30°C 2分 | |
| 2) | ハイブリッドRNA (hybrid RNA) の分 第一鎖 (First strand) c DNA 5 × Hybrid RNA 分解(Degeneration) バッフ dH_2O | |
| 5 | | |

| | | | |
|----|--|---|--|
| | リボヌクレアーゼH (RNaseH) | 1 | |
| | 76 μL | | |
| 3 | 30°C 1時間 | | |
| | 反応後、エタノール沈殿を行った。 | | |
| 5 | | | |
| 8 | 3) ライゲーション (Ligation) 反応による一本鎖cDNAの環化 | | |
| | 5×RNA(ssDNA) ライゲーション(Ligation)バッファ 8 | | |
| | 4.0%ポリエチレングリコール (PEG) #6000 20 | | |
| | dH ₂ O 1.2 | | |
| 10 | エタノール沈殿のペレット | | |
| | T4 RNAリガーゼ (ligase) 1 | | |
| | 15°C 1.5時間 | | |
| | 41 μL | | |
| 15 | 4.) 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) | | |
| | ライゲーション (Ligation) 反応後のサンプル 1 | | |
| | プライマー No.3 (5 pmol / μL) 2 | | |
| | プライマー No.4 (5 pmol / μL) 2 | | |
| | dH ₂ O 2.0 | | |
| 20 | One shot LA PCR Mix (商品名) 2.5 | | |
| | 50 μL | | |
| | 94°C 3分 → (94°C 30秒、52°C 30秒、72°C 120秒) × 25サイクル | | |
| 25 | 5) 第2回ポリメラーゼ連鎖反応 (Second PCR) | | |
| | 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) 産物 2 | | |
| | プライマー No.5 (5 pmol / μL) 2 | | |

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物を1%アガロースゲル電気泳動後、ゲルをE.T.B染色した。ゲルからDNA断片を MiniElute Gel Extraction Kit (キヤン製) を用いて回収し、回収したDNA断片を DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) に連結し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて、回収したDNA断片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結されたプラスミドを用いて、大腸菌DH5 α を形質転換させた。最終的に、大腸菌よりプラスミドを精製して、DNAの塩基配列を決定し、GenBank Accession No.AF000357およびGenBank Accession No.AF000356と同一の配列であることを確認した。

審査例8：[43-2C1] バイスペシフィック抗体薬理プラスミドの構築

号27)

フラグメント1、2、3のPCR条件

第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR)

| | | |
|----|---------------------------|-------------|
| 5 | テンプレート (Template) 1 | 2 |
| | テンプレート (Template) 2 | 2 |
| | リンカー (100 ng/ μ L) | 2 |
| | リンカー (100 ng/ μ L) | 2 |
| 10 | d H ₂ O | 17 |
| | One shot LA PCR Mix (商品名) | 2.5 |
| | | 5.0 μ L |

95°C 5分 → (94°C 30秒、40°C 30秒、72°C 60秒) × 20サイクル

第2回ポリメラーゼ連鎖反応 (Second PCR)

第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) 製物

15 プライマー (5 pmol/ μ L)

プライマー (5 pmol/ μ L)

4 d H₂O

One shot LA PCR Mix (商品名)

20 5.0 μ L

95°C 5分 → (94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 60秒) × 30サイクル

DNAフラグメント1、2、3とプラスミドpBluescriptII SK(+) (ストラテジン製) をそれぞれ、制限酵素 EcoRI・KpnI・KpnI・SphI・SphI・XbaI・XbaI・XbaIを用いて消化し、1%アガロース電気泳動を行った後、DNA断片を MinElute Gel Extraction Kit を用いてゲルから精製した。次に、この3個

のフラグメントヒプラスミドpBluescriptII SK(+) (ストラテジン製) をDNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて連結し、連結されたプラスミドを用いて大腸菌 DH 5 α を形質転換した。大腸菌よりプラスミド J43-2C11scDb-pBluescriptII SK(+)を調製し、挿入部分の塩基配列を確認した (配列番号 2.8)。

5 塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表に示す (配列番号 2.9)。
J43-2C11scDb-pBluescriptII SK(+)を制限酵素 BamHI よりび XbaIで切断し、切断してきた BamHI-XbaI 断片と BamH I-BamH I 断片のうち、最初に BamHI-XbaI 断片を BamH I よりび XbaI で切断した哺乳動物細胞発現用ベクタ-pSectTag2Hygro B (インビトロジェン製) と連結した。次に BamHI-XbaI 断片と連結した pSectTag2Hygro B を再び制限酵素 BamH I で切断し、もう一方の BamH I-BamH I 断片と連結した。連結したプラスミドを用いて大腸菌 DH 5 α を形質転換した。最終的に、大腸菌よりプラスミド J43-2C11scDb-pSecthygro B を調製し、作製した J43-2C11 バイオペシフィック抗体の塩基配列を確認した (配列番号 3.0)。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表に示す (配列番号 3.1)。

15 実施例 9 : J43-2C11 バイオペシフィック抗体の発現
D MEME) に懸濁し、Type Ic コラーゲンをコートした 1.5 mmディッシュに播種した。翌日、細胞を 1.0 mL の D MEME で洗浄した後、LipofectAMINE-plus を用いて J43-2C11scDb-pSecthygro B を遺伝子導入した。3 時間後、5 mL の 4.0%ウシ胎児血清を含む D MEME を添加した。2 日目に細胞を 1.0 mL の D MEME で洗浄して新たに 2.0 mL の D MEME を添加し、4 日目に培養上清を回収した。

20 25 遠心により細胞を除去後、0.22 μ m PVDF フィルターを通した。上清を透析チューブにいれ 4.0% PEG20000 を含む PBS 中で透析し、濃縮した。

濃縮した上清を HITrap chelating HP column(アマシャムファルマシア製)を用いて精製した。さらに、精製度を高めるために Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution(アマシャムファルマシア製)を用いて、グルロ過濾型した。

5 実施例110：T細胞の活性化の抑制

BALB/cマウスから脾臓を摘出後、脾臓をセルストレイナー($70\mu\text{m}$ Nyro)を通して細胞を調製した。調製した細胞を遠心して回収後、溶血バッファー[NH₄C₁(0.8%)、KCO₃(0.1%)、EDTA(1 mM)]を加え、赤血球を溶血させた。その細胞を PBS(-)で1回洗浄後、mouse CD3 T cell enrichment column kit(R&D製)を用いてT細胞を精製し、 5×10^6 個/mLの割合で培地(10%ウシ胎児血清を含むPRMI640)に懸濁した。予め $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CD3抗体(クローン名KT3)を37℃で3時間コートした96 wellプレートに、先に調製したT細胞を 2×10^6 個/ $100\mu\text{L}$ /wellの割合で播種し、さらに培地で希釈したJ43-2C11ペイスペシフィック抗体(0.01、0.03、0.1、0.3、1、 $3\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)を添加して、37℃、5%CO₂条件下で72時間培養した。72時間後、培養上清を回収し上清中のIFN- γ の濃度を Quantikine Immunoassay Kit(R&D製)を用いて定量した。

図6に示すように、J43-2C11ペイスペシフィック抗体はインビトロ(in vitro)において活性化させたマウスマウス脾臓T細胞の産生するIFN- γ の量を用意存的に減少させた。

- PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質。
- PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる2価物質である請求の範囲1に記載の物質。

- T細胞を認識する物質およびタンパクである請求の範囲1または2記載の物質。
- T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質。
- およびリンカーからなる請求の範囲1または2記載の物質。
- PD-1を認識する物質、T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質。
- およびリンカーからなる請求の範囲1または2記載の物質。
- PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々2から5量体である請求の範囲1乃至4のいずれかに記載の物質。
- PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が抗体である請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。
- リンカーが有機化合物からなる請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

9. リンカーがペプチドからなる請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体の遺伝可変領域と恒常可変領域を含む複数のペプチドで構成される請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

5 チドである請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

11. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体の遺伝可変領域と恒常可変領域を含む複数のペプチドで構成される請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

10 12. PD-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、各々ペプチドである請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

13. 請求の範囲1に記載の物質を、PD-1が関与する疾患の治療および

15 /または予防に有効な量含有する薬学的組成物。

14. 疾患が神経変性疾患、自己免疫疾患、臓器移植片拒絶反応、腫瘍および感染症からなる群から選ばれる疾患である請求の範囲1-3に記載の薬学的組成物。

20

15. 神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マッヤド・ジエセ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病からなる群から選ばれる請求の範囲1-4に記載の薬学的組成物。

25 16. 自己免疫疾患が、系統性骨炎、關節炎、抗環状核糖核酸疾患、膠原性大腸炎、シェーダレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性

图 1

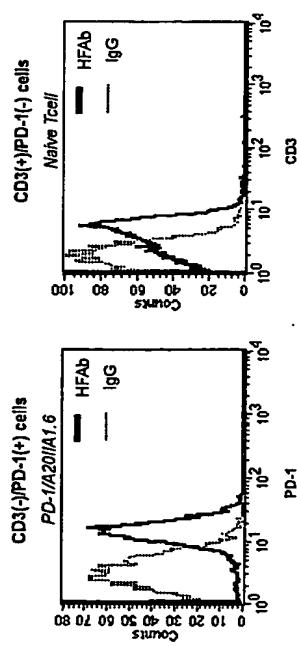


图 3

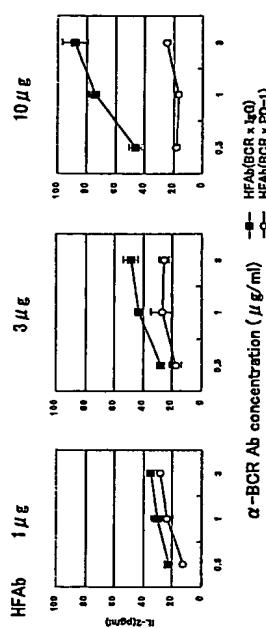


图 2

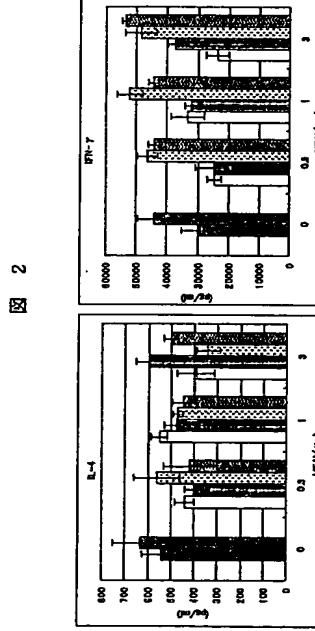
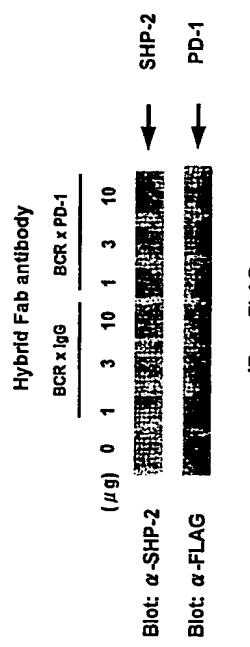
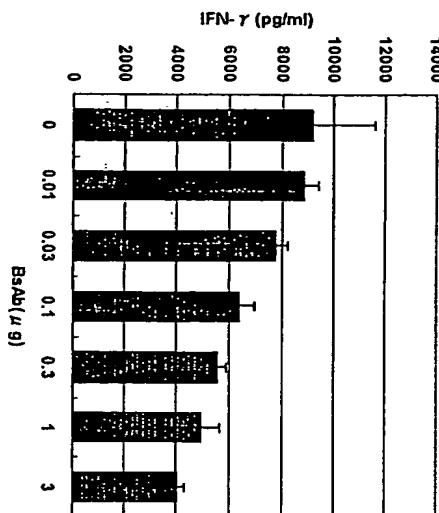
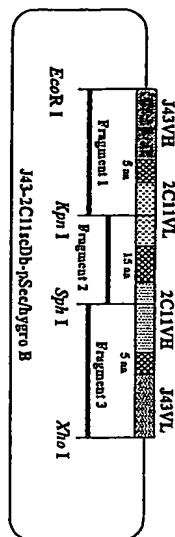


图 2



८४

SEQUENCE LISTING



10

HONJO, Tatsuki
HONJO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu

```

<(220)> Designed DNA based on amino terminal sequence of monoclonal antibody J43 light chain to act as a degenerated primer
<(221)> :
<(222)> misc_feature
<(223)> (9)..(9)
<(224)> n=a, t, c or g

```

| | | |
|--------------------|---|-----|
| <220> | Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys | 336 |
| <221> | misc_feature | 95 |
| <222> | (18)..(18) | 90 |
| <223> | n=a, t, c or g | 100 |
| <400> 2 | toygarctna cincarccccc | 20 |
| <210> 3 | ttt tat ttg acc acc ctc acc ctc acc ctc cta gat gaa ccc | 384 |
| <211> 798 | Lau Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Glu Val Thr Val Leu Gly Pro | 110 |
| <212> DNA | 100 | 105 |
| <213> Mus musculus | 115 | 120 |
| <220> | ttt tat ccc aaa gtc aca ctc gtt ttt cca ctc tca ggt gaa ctc | 384 |
| <221> CDS | Lys Ser Pro Lys Val Thr Val Pro Pro Ser Pro Glu Leu | 125 |
| <222> (1)..(645) | 130 | 135 |
| <223> | 140 | 145 |
| <220> 3 | ggg aca aac aac gcc aca ctc gtt ttt gtt aat gac ttc tac ccc | 432 |
| <221> | Arg Thr Asn Lys Ala Thr Lau Val Cys Lau Val Asp Phe Tyr Pro | 150 |
| <222> (1)..(645) | 155 | 160 |
| <223> | 165 | 170 |
| <400> 3 | ttt tat gca acc gtt acc ttt gaa aat gga gca act atc aat gat | 480 |
| <220> | Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp | 175 |
| <221> mat_peptide | 180 | 185 |
| <222> (1)..(645) | 190 | 195 |
| <223> | 200 | 205 |
| <220> 3 | ttt tat gca acc ttc ttt gaa aat ttt gca gat | 48 |
| <221> mat_peptide | Tyr Glu Lau Thr Glu Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr | 15 |
| <222> (1)..(645) | 10 | 10 |
| <223> | 20 | 25 |
| <400> 3 | ttt tat gca acc ttc ttt gaa aat ttt gca gat | 96 |
| <220> | Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp | 30 |
| <221> mat_peptide | 25 | 30 |
| <222> (1)..(645) | 30 | 35 |
| <223> | 35 | 40 |
| <220> 3 | tgt ttt cat cca aag tca gtc ccc ttt tca gtc aat gta gaa ggg act | 144 |
| <221> mat_peptide | Tyr Phe His Glu Arg Ser Asp Glu Thr Ile Leu Glu Val Ile Tyr Asp | 40 |
| <222> (1)..(645) | 40 | 45 |
| <223> | 45 | 50 |
| <220> 4 | atc atg cgc ccc tcg ggg atc ccc gaa aya atc tct ggg tec acc | 192 |
| <221> mat_peptide | Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser | 50 |
| <222> (1)..(645) | 55 | 60 |
| <223> | 60 | 65 |
| <210> 4 | tca aca aca aca gca acc ttt aca ggt gtc cgg act gag gat | 240 |
| <211> 214 | Ser Gly Thr Ala Thr Lau Val Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp | 80 |
| <212> PRT | 70 | 75 |
| <213> Mus musculus | 75 | 80 |
| <400> 4 | ttt aat gat gtc tat ttc ttc ttc tca gaa tat att tat att tat att | 288 |

Tyr Glu Leu Thr Cys Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Glu Gly Glu Thr
 1 5 10 15

Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp
 20 25 30

Val Ser Cys Cln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu
 195 200 205

Ser Pro Ala Glu Cys Leu
 210

Trp Phe His Cln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr Asp
 35 40 45

Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys
 85 90 95

Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gin Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro
 100 105 110

Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu
 115 120 125

<400> 5
ccccaggat caggatgg a

<210> 6
(211) 21
(212) DNA
(213) Cricetulus migratorius

<210> 7
(211) 21
(212) DNA
(213) Cricetulus migratorius

21

<400> 6
tttccccac accccccgtt c

<210> 7
(211) 21
(212) DNA
(213) Cricetulus migratorius

<400> 7
cgtaatgcgtg aactctgtgg c

21

Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp
 145 150 155 160

Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly Gln Asn Tyr Met Thr
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp Lys Ser His Asn Arg
 180 185 190

<400> 8

15
20
2

30 35 40

SIXTEEN HUNDRED EIGHTY-THREE

卷之三

Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

Arg Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr

110 115 120

卷之三

123 130 139

140

21

⟨212⟩ DNA

卷之三

〔210〕 13

<212> DNA
<213> *Mus musculus*

8/24

```

<400> 13
tggaggaaac ttggaccatgg tt

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 14
gacatccatc tggcccgatc tc

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 15
ttttttttttt cgtttttttttt cag

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 16
ttttttttttt cgtttttttttt t

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 17
gtttttttttt tttttttttttt tcc

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 18
cgtttttttttt tttttttttttt ctt

```

| | | |
|---------------|----------------------------|------------------------------|
| (C110) | 19 | taataatgtatgg caccgactcc arc |
| (C111) | 23 | |
| (C112) | DNA | |
| (C113) | <i>Wus</i> <i>musculus</i> | |
| (400) | 19 | |

| | | |
|-------|--------------|----------------------------|
| <210> | 20 | |
| <211> | 23 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Mus musculus | |
| <400> | 20 | ttagggctctt ggatccactt tca |

(220) <223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of J43 and the light chain of 145-2C11

ggacccaa gtcactgtct cctcaggatgg aggccgttca gacatcgaa tgacctggc
tcctat

<210> 23
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of J43 an
 d the light chain of 145-2C11
 .
 <400> 23
 tccttgtttt cagtgtacaga ggatgtccaaat tcggccaaat ctgttaggtctt aatcgatcagg
 arata

| | | |
|-------|---------------------|---|
| <210> | 24 | |
| <211> | 95 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220> | | Designed DNA to act as a linker between the heavy and light chain |
| <223> | | |

| | | | |
|-------|----|---|----|
| <40D> | 24 | acccggacaa aacgttggaa tttttttttt ggccggatgt ggccggatgt ggccggatgt | 60 |
| | | tggccatgt tttttttttt ttgtttttttt ttgtttttttt | 95 |

| | |
|-------|---|
| C212) | DNA |
| C213) | Artificial Sequence |
| C220) | Designed DNA to act as a linker between the heavy and light chain |
| C223) | s of 145-2C11 |

| | | | |
|-------|----|---|----|
| <101> | 25 | tgccctgt ttcgacccttt agtttccact tcggccaaat cgccttcat cggagccccc | 60 |
| | | accgccttagc ctccatcgcc accactctgg acccc | 95 |

(210) 26
(211) 65
(212) DNA
(213) Artificial Sequence

(220) Designated DNA to act as a linker between the heavy chain of 14C-20
(221) 23

11 and the light chain of J43

| | | | | |
|--|-----|--|-----|-----|
| tttag | 65 | get ccc ata tac acg aca agt tat aat tat gca act tat tac tgg ggt Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly | 192 | |
| (210) 26 | 60 | 50 | 55 | 60 |
| aaagccatcg ttccccgttc ccccgatgtt aacgcgttca tatggatgtta ctccggccacc | | | | |
| tttag | 65 | tgg gtc aac gtc aca tcc acc stc tec aca gat gat tec cca aca age atg Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Met | 240 | |
| (210) 27 | 70 | 65 | 70 | 80 |
| (211) 65 | | | | |
| (212) DNA | | | | |
| (213) Artificial Sequence | | | | |
| (220) | | | | |
| (223) Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of 145-2C | | | | |
| (220) | | | | |
| (223) Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of 145-2C | | 11 and the light chain of J43 | | |
| (400) 27 | 60 | 100 | 105 | 110 |
| tccctggatc ccgtttccggaa ggatcccaacc ttccggcaat ttatccgtttt | | | | |
| atgc | 65 | 115 | 120 | 125 |
| (210) 28 | | | | |
| (211) 1437 | | | | |
| (212) DNA | | | | |
| (213) Artificial Sequence | | | | |
| (220) | | | | |
| (223) Designed DNA to produce the bispecific antibody | | | | |
| (220) | | | | |
| (221) CDS | | | | |
| (222) (1)..(1437) | | | | |
| (223) | | | | |
| (400) 28 | | | | |
| ggg tgg ctt ctc ggg tat ggt ggg ggg ttc acc ttc acc gat gac tat | 48 | 130 | 135 | 140 |
| Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly | 5 | 10 | 15 | 160 |
| atc aat aat ttg gca gat ggg gtc cca tca aag ttc aat ggc aat ggt | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Asn Lys Ile Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly | 180 | 185 | 190 | 195 |
| tgg taa cag cag aca cca ggg aac get cct aac ctc ctg atc tat tat | 528 | 165 | 170 | 175 |
| Tyr Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr | | | | |
| atc aat aat ttg gca gat ggg gtc cca tca aag ttc aat ggc aat ggt | 576 | 180 | 185 | 190 |
| Thr Asn Lys Ile Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly | | | | |
| tct gag age gar tat ttc act stc acc ttc acc age ctg gaa tcc gaa gat | 624 | 195 | 200 | 205 |
| Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp | | | | |
| att ggt tct tat tat tgg caa cag tat tat aac tat cog tgg age ttc | 672 | | | |
| Tle Gly Ser Tyr Tyr Cys Glu Gly Tyr Tyr Asn Tyr Pro Tpr Thr Phe | 210 | 215 | 220 | |
| ttc atg aac ttt ttc ctc ctc cag aat can ggg aag ggg ctg ggg tgg gtt | 144 | | | |
| Pho Met Ser Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | 35 | 40 | 45 | 295 |
| ttc atg aac ttt ttc ctc ctc ctc cag aat can ggg aag ggg ctg ggg tgg gtt | 170 | | | |
| Pho Met Ser Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | 295 | 300 | 305 | 310 |
| ttc atg aac ttt ttc ctc ctc ctc cag aat can ggg aag ggg ctg ggg tgg gtt | 240 | | | |

| | | |
|-----|--|------|
| 788 | ggc tcc ttc acc ggc gga tgg ggt cgg cgg gag tcg gag tcg gag tcg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Val Glu Val Glu Ser Gly | 816 |
| 789 | ggc ttc acc ggc gga tgg ctt ccc ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Lys Ser Leu Ser Cys Glu Ala | 864 |
| 790 | tct ggg ttc acc ttc acc ggc tat ggc atg cac ttt gtc cgc cag get Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Glu Ala | 912 |
| 791 | tat ggg aat ggg ctg gag tgg gca tac att act act agt agt att Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ile | 960 |
| 792 | aat atc aas tat gct gac get gtt gaa ggc cgg ttc gtc gtc tcc aga Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Glu Arg Phe Thr Val Ser Arg | 1008 |
| 793 | 3095 310 315 320 | 320 |
| 794 | gac aat gtc aag aac tta ctt ctt ctt ctt atg sac att ctc agg tct Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Glu Met Asn Ile Leu Lys Ser | 1056 |
| 795 | 325 330 335 | 335 |
| 796 | gag gac aca gcc atg tac tac tgt gca aga ttc gac tgg gag aas sat Glu Asp Thr Ile Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Asp Lys Asn | 1104 |
| 797 | 340 345 350 | 350 |
| 798 | tac tgg ggc cca gga acc atg gtc acc gtc tcc ctt gtc ctt gtc ggc ggt Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Cys Gly Gly | 1152 |
| 799 | 355 360 365 | 365 |
| 800 | tat gac tgg act ctt ctt Ser Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu | 1200 |
| 801 | 370 375 380 | 380 |
| 802 | act gtc aas atc aac tgg tct ggg gac eas tgg cgg aas kat ttt gca Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Tyr Phe Ala | 1248 |
| 803 | 385 390 395 | 400 |
| 804 | gat aat aag ccc tcc tgg ggg atc oct gas aas gtc ttt gca Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Phe Glu Arg Ile Ser Gly Ser | 1296 |
| 805 | 405 410 415 | 420 |

Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Glu Gly Thr Gln Val Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 115 120 125
 Gln Val Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg
 130 135 140
 Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Tyr Tyr
 165 170 175
 Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Asp Phe Ser Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Gly Asp
 195 200 205
 Ile Oly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe
 210 215 220
 Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gin Ala
 275 280 285
 Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile
 290 295 300
 Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Glu Met Asn Ile Leu Lys Ser
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn
 340 345 350
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu
 370 375 380
 Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala
 385 390 395 400
 Asp Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr
 405 410 415
 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser
 420 425 430
 Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu
 435 440 445
 Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser
 450 455 460
 Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 465 470 475

<210> 30
<211> 1656
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Designated protein to act as the bispecific antibody

<222> (1)..(1656)

<223>

<220>
<221> sig_peptide
<222> (64)..(63)

<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (64)..(1653)

<223>

<400> 30
atg gag acc gac sca ctc ctc ctc tgg gta ctc ctc tgg gtt cca
Met Glu Thr Asp Thr Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro
-20 -15 -10

gtt tcc act ggt gac ggc ccc ttc ccc tgg cag gtc ccc ccc
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Ala Arg Arg Ala Arg Thr
-5 -1 1 6 10

agg ctt gat acc gag ctc gta ccc tgg ctc cag gaa ttc ggt
Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Pro Gly Leu Glu Glu Phe Glu Val
15 20 25

cgg ctt ctg gag tct ggt gga tta gtg:agg cct gag ggg tca ctc
Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu
30 35 40

aaa ctc tac tct gtt ggc tct gga ttc acc ttc agg gac tat ttc atg
Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met
45 50 55

agg tgg gtc cgc cag act cca ggg aag ggg ctc gag tgg gtt get cac
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ile Lys Gly Gln Val Ala His
60 65 70 75

ata tac acg aas agg tat tat gca act tat tac tat ggt:tcg gtg
Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val
80 85 90

aaa ggc agg ttc acc atc ttc agg aat gat tcc cga aatc atg gtc tac
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Arg Ser Met Val Tyr
95 100 105

ctg cca atg aac aac ctc agg aat gag gag acc atc gtc act tat tac tat
Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
110 115 120

aca agg aat gga agg aat ccc tct ctg get ttc tgg ggt eaa ggg
Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly Glu Gly
125 130 135

acc eaa gtc act gtc tcc tca get gaa ggg agg tca gag atc ctc atg
Thr Glu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Asp Ile Glu Met
140 145 150 155

acc cag tat cca tca tca ctc ctc gca gac agg aca gtc act
Thr Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ala Ser Leu Glu Asp Arg Val Thr
160 165 170

atc aat tat cag gcc aat gag gag att egc aat tat tta aac tgg tac
Ile Asn Cys Gin Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
175 180 185

cag cag aaa cca ggg eaa gtc cct aag ctc ctc atc tat tat aca east
Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Asn
190 195 200

aaa ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc aat gtc aat ggt tct ggg
Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
205 210 215

aga get tat tat ttc act acg aca gtc gag tcc gat att ggg
Arg Asp Ser Ser Pho Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp Ile Gly
220 225 230 235

tct tat tac tat can cog tat tat aac tat ttc tgg aca ttc gca cct
Ser Tyr Tyr Cys Glu Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Glu Pro
240 245 250

ggc acc aag ctc gaa atc aca ggt gca ggt tca ggc ggt tca ggc ggt ggc
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gln Val Gly Gly
255 260 265

45 50 55 240 245

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His
60 65 70 75 255 260 265

Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Als Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val
80 85 90 95 270 275 280

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Met Val Tyr
95 100 105 110 285 290 295

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
110 115 120 125 300 305 310 315

Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
125 130 135 140 320 325 330

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
140 145 150 155 335 340 345

Thr Gln Ser Pro Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr
160 165 170 175 350 355 360

Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
175 180 185 190 365 370 375

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn
190 195 200 205 380 385 390 395

Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220 225 400 405 410

Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln
220 225 230 235 415 420 425

Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
240 245 255 260 265 270 275 280

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
285 290 295

Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly
305 310 315

Phe Thr Thr Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly
320 325 330

Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile
335 340 345

Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn
355 360 365

Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp
370 375

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp
385 390 395

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Tyr
395 400 405

Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr Val

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / TBO3 / 07735

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07735

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Claim or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | NISHIMURA H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol.10, No.10, Pages 1563 to 1572 | 1-25 |

| 国際検査報告書 PCT/JP02/07735 | | | |
|---|---|------|--|
| A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類 (IPC)) Int. C1, C07K16/46, A61P1/02, A61P5/00, A61P37/00, A61P39/00 // A61K 38/00 | | | |
| B. 調査を行った分野 WPI / BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS) MEDLINE (STN) | | | |
| C. 国際特許で使用した電子データベース(データベースの名前、調査に使用した用語) WPI / BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS) MEDLINE (STN) | | | |
| C. 誤述すると誤められる文獻 引用文獻の カテゴリーや 引用文獻名 及び一部の箇所が誤植するときは、その誤植する箇所の表示 明記する 請求の範囲の番号 | | | |
| P X | Okazaki T. et al., PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol. 98, No. 26, pages 13866-13871 | 1-25 | |
| A | JP 7-291996 A (本底特) 1995.11.07, 全文 & EP 670369 A2 & US 5629204 A & US 5698520 A | 1-25 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の傍書きにも文獻が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パンフレットフリーミラーに関する別紙を参照。 | | | |
| <p>* 引用文獻のカテゴリー 「A」他に明記のある文獻ではなく、一般技術者でも理解できる文獻 「B」国際出願日前の出版または特許であるが、国際出願日の明確化のために引用するもの 「C」以後に公表されたもの 「D」既知技術に著しい特別な趣旨を想起する文獻又は他の文獻の発行 「E」明記のない文獻であるが、新規性又は選択性がないと考えられるもの 「F」明記のない文獻であって、当該文獻と他の1以上の文獻との、当業者にとって自明である組合せによって選択性がないと考えられるもの 「G」国際出願日前で、かつ既往の主張の範囲外となる出願 「H」同一パテントファミリー文獻 「I」国際出願を完了した日 「J」国際特許の登録の発送日 「K」特許庁審査官(権限のある機関) 「L」日本国特許庁 (ISA/JP) 電話番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p> | | | |
| 国際調査を完了した日 26. 09. 02 国際特許の登録の発送日 08.10.02 国際調査機関の名前及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 電話番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 特許庁審査官(権限のある機関) 本間 嘉子 4 N 3126 (捺印) | | | |

様式PCT/ISA/210(Continuation of second sheet)(July 1998)

請求項番号

国際出願番号 PCT/JP02/07735

| | |
|----------------|--------------------------------|
| C (参考) . | 請求すると認められる文書 |
| 引用文献の カテゴリ* | 引用文献 及び他の文献が記載するとき、その記載する範囲の表示 |

A

Freeman G. J. et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.

J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.7, pages 1027-1034

請求の範囲の番号

1-25

Nishimura H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol.10, No.10, pages 1563-1572

1-25

1980
1981
1982
1983
1984
1985

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)